

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-129216

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月11日

A 61 K 31/23  
// C 07 C 69/587

ADD

7330-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 脂肪輸液

⑮ 特 願 昭60-268167

⑯ 出 願 昭60(1985)11月28日

⑰ 発 明 者	浜 崎	智 仁	富山市五福末広2556-4, 2-101
⑱ 発 明 者	幕 田	昌 弘	八王子市堀之内1755-251 南陽台61-15
⑲ 発 明 者	秦	和 彦	八王子市北野町559-6
⑳ 発 明 者	宗 田	靖 二	神戸市東灘区本山北町4-5-11
㉑ 発 明 者	宮 元	彰	西宮市高須町1-1番16-316
㉒ 発 明 者	七 野	藤 美	高槻市柱本新町12
㉓ 出 願 人	日本水産株式会社		東京都千代田区大手町2丁目6番2号
㉔ 出 願 人	日本商事株式会社		大阪市東区石町2丁目30番地
㉕ 代 理 人	弁理士 佐藤 一雄		外2名

# 明 細 書

1. 発明の名称 脂 肪 輸 液

2. 特許請求の範囲

高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドを含む脂肪輸液。

3. 発明の詳細な説明

(技術分野)

本発明は新規な脂肪輸液、より詳細には、高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドを含み、特に血小板凝集抑制剤として有効な脂肪輸液に関するものである。

(従来技術とその問題点)

20個の炭素原子、5個の二重結合を有する多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(以下、時にEPAと略称する)は、血小板凝集抑制作用を有し、従って血小板凝集に起因する血栓性疾患、例えば、心筋梗塞、脳血栓等の治療、予防

に有効であることが知られている。

このEPAは天然の魚油、たとえば、イワシ油、サンマ油、サバ油等の中に遊離の酸又はトリグリセリドの形で含まれている。しかし天然の魚油中には炭素数又は二重結合数の近接した各種の不飽和脂肪酸が多く含まれているためEPAの含有量を高めるよう魚油を濃縮することはさきわめて困難であり、現在では特開昭59-67241号公報記載のように、EPA含有量を約30%まで濃縮するのが限界である。

しかし、この程度の純度では血小板凝集抑制作用を効果的に発揮させるためにはかかる濃縮魚油を多量に投与することが必要であり、そのため多量に存在するEPA以外の脂肪酸のために多量のカロリーを与え、栄養過多を来すおそれがある外、また副作用を来す場合があるなど、魚油そのものを医薬品に利用するには種々問題点があった。

(目的)

かくて本発明はEPAを含み少量の投与で有効な血小板凝集抑制効果を発揮しうる血小板凝集抑

制剤を提供することを目的とするものである。

本発明者らが種々実験、研究を重ねた結果、高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドを含む脂肪輸液によるときは少量の投与で、栄養過多等の弊害を来すことなく、血小板凝集抑制作用を発揮し、血栓性疾患の治療、予防に有効に利用し得、上記目的を達成しうることが見出されたのであり、本発明はこのような知見に基づくものである。

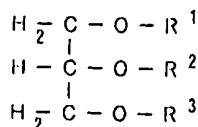
(発明の概要)

よって、本発明は高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを含む脂肪輸液を提供するものである。

(発明の具体的説明)

本発明に係る脂肪輸液では高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリド(以下、時にEPA-TGと略称する)を用いるのである。

一般に脂肪酸のトリグリセリドは、脂肪酸残基を $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ で表わすとき、次の式で表わされる。



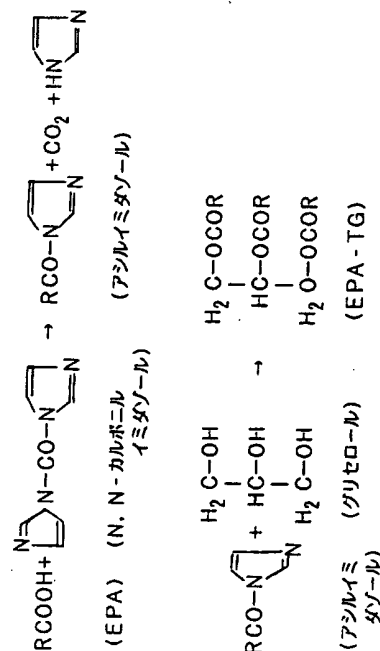
エイコサペンタエン酸トリグリセリドの場合、上記式中脂肪酸残基 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ はともにエイコサペンタエノイル基(EPA基)である。しかし本発明の場合このように三つの脂肪酸残基ともにエイコサペンタエノイル基であるグリセリドを主体とはするが、これら三つの基の内いずれか二つ又は一つがエイコサペンタエノイル基であり他の一つ又は二つが他の脂肪酸残基であるグリセリドをも含むものとする。

而して本発明で高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドとは上記エイコサペンタエン酸トリグリセリドの脂肪酸残基全量に対するEPA基の割合が80%以上、好ましくは90%以上のものを云う。

本発明における高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリド(EPA-TG)を製造する方法

の一例をあげれば、これは高純度のEPA、例えば特開昭57-187397号公報又は特開昭58-8037号公報に記載された方法によってつくられた80%以上好ましくは90%以上の高純度のEPAとグリセロールとを縮合剤の存在下室温で反応させることによってつくることができる。例えば、先ず上記EPAとN,N'-カルボニルイミダゾール縮合剤とを窒素ガスの如き不活性ガス下、溶媒中で反応させてアシルイミダゾールとし、次いでこれをイミダゾールと水素化ナトリウムとからえられるイミダゾールナトリウムを触媒として溶媒中でグリセロールと反応させると、用いた出発原料EPAの純度に相当する高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを得ることができる。ここに用いる溶媒としては無水テトラヒドロフラン、無水ジメチルスルホキシド、無水アセトニトリル、無水ベンゼン等を挙げることができる。

このようにしてEPAからEPA-TGを製造する反応を式に示すと次のとおりである。



本発明の脂肪輸液はこのようにしてえられた高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリド

(EPA-TG)と、乳化剤(卵黄リン脂質、大豆リン脂質等)とグリセロールを蒸留水中に分散させ加圧乳化することにより調製することができる。量はEPA-TG 10重量部に対して、乳化剤1~2重量部、グリセロール2~3重量部が好ましく残量の水を加えて100重量部にするのが好ましい。

#### (作用)

このようにしてつくられた脂肪輸液は通常静脈に注射投与される。このように静脈に投与することにより経口投与できないような緊急な場合にも投与することができ、また経口投与するときよりも早期に血小板凝集抑制を発現させることができる。しかも高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを含んでいるので少量の投与で有効であり、栄養過多を来たすことなく、少量混在する不純物による副作用も少なく血小板凝集を抑制して血栓症等の治療、予防に有効に用いることができ

る。而も肝機能障害を来すこともなく高脂血症になることもなく医薬品として良好に利用することができる。

更にこの原料となるEPAはイワシ油、サバ油等の魚油であり、魚油ひいては水産資源の有効利用をはかることができる。

#### (実施例)

以下に本発明の脂肪輸液に用いる高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造例と脂肪輸液の試験例を順に挙げて本発明を更に説明することとする。尚製造例1, 2で原料として用いられたエイコサペンタエン酸はいずれも特開昭57-187397号公報記載の方法でえられた純度90%のものである。

#### 製造例(1)

N, N'-カルボニルジイミダゾール14g (86.4 mmole)を無水テトラヒドロフラン40mlに懸濁させ、これにエイコサペンタエン酸21.8g (72 mmole)の無水テトラヒドロフラン溶液(約40ml)を加え窒素気流下空温にて

2時間撹拌する。上記反応液にグリセロール1.84g (20 mmole)の無水ジメチルスルホキシド溶液20mlを加え、さらにイミダゾールナトリウムのテトラヒドロフラン溶液20ml(イミダゾール6gと水素化ナトリウム(油中約50%)1.45gを無水テトラヒドロフラン20ml中で1時間反応させ調製したもの)及び無水ピリジン1mlとを加え、窒素気流下18時間反応させる。得られた反応液にクロロホルム200mlを加え、これを1N-HCl 60mlにて中和し、メタノール100mlを加え、分液漏斗で分液し、その下層を分離し濃縮する。その濃縮物をヘキサン-エーテル

(96:4)混液にとかし、同溶媒で処理したシリカゲル200gを充填したカラムに通し、これを同溶媒6mlで溶出する。溶出液を薄層クロマトグラフィーで検索し、目的とする90%の高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリド10.5gを得る(収率55.3%)。

本品は薄層クロマトグラフィー(Silicagel

plate F254 E. Merck、展開溶媒ヘキサン-エーテル(85:15)、検出試薬:沃素)上、単一のスポットを示した。本品の質量分析スペクトル、核磁気共鳴(NMR)スペクトル、赤外吸収(IR)スペクトルの測定結果を順に第1~3図に示した。質量分析(第1図)では分子イオンピーク( $M^+$ )が $m/e$  944 ( $C_{63}H_{92}O_6$ )に認められた。

$^1H$ -NMRスペクトル $\delta$ 値( $CDCl_3$ , ppm)(第2図)

$\delta$  ppm

0.95 (t, 9H)

1.2~2.5 (m, 24H)

2.82 (m, 24H)

4.1~4.3 (m, 5H)

5.1~5.6 (m, 30H)

IRスペクトル,  $cm^{-1}$  (NaClセル, Neat)(第3図)

2960 ( $\nu_{as} CH_3$ )

1740 ( $\nu_{C=O}$ )

1660 ( $\nu_{C=C}$ )710 ( $\delta_{CH}$  面外)

## 製造例(2)

N, N'-カルボニルジイミダゾール

12.85g (79.2 mmole) とエイコサペン  
タエン酸 20.5g (66 mmole) とを、無水ア  
セトニトリル 30 ml に溶解し、窒素気流下空温に  
て1時間攪拌する。この反応液に、グリセロール  
1.84g (20 mmole) の無水ジメチルスルホ  
キシド溶液 20 ml を加え、さらに、イミダゾール  
ナトリウムのジメチルスルホキシド溶液 20 ml  
(イミダゾール 5g と水素化ナトリウム 1.44  
g (油中 50%, 30 mmole) を無水ジメチルス  
ルホキシド中 (20 ml) で1時間反応させ調製し  
たもの) 及びピリジン 5 ml とを加え、窒素気流下  
3時間空温で攪拌する。得られた反応液にヘキサ  
ン-1N-HCl-メタノール混液 (300 ml:  
100 ml:100 ml) を加え、分液漏斗で分液す  
る。水層を更にヘキサン 200 ml で3回抽出し、  
先のヘキサン層と合する。ヘキサン層を次いで、

飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 100 ml、及び飽  
和食塩水 200 ml で洗浄する。ヘキサン層を濃縮  
し、ヘキサン-エーテル混液 (96:4) にその  
濃縮物を溶かし、同溶媒系で処理したシリカゲル  
400g を充填したカラムに通し、これを同溶媒  
8 l で溶出する溶出液を薄層クロマトグラフィー  
で検索し、目的とする90%の高純度エイコサペ  
ンタエン酸トリグリセリド 16.65g を得る  
(収率 88%)。

## 試験例

(I) 上記製造例でえられた純度90%のEPA-TGを含む脂肪輸液をつくり、これを家兔に  
静脈に注射投与してその血小板凝集抑制作用を測  
定し、これを同様に上記特開昭59-67241  
号公報記載の方法でえられた30%EPA-TG  
を含む魚油からつくられた脂肪輸液と対照品とに  
ついて実施して行なわれた結果と比較した。

## 1. 試料油

- i) 90%EPA-TG
- ii) 30%EPA-TG

iii) 大豆油 (商品名 Infracat) 対照品

## 2. 輸液組成 (100 ml)

試料油	10g
グリセロール	2.5g
卵黄リン脂質	1.2g
水	残り

各試料油よりなる輸液組成について体重約3kg  
の家兔を5~6羽づつ用い、投与前に採血し、採  
血後1日目に30mlの輸液を静注、4日目に更に  
30mlを静注し、7日目に再度採血した。

血液はクエン酸ソーダの少量を含むシリンジに  
採血し、一定血小板数の多血小板血漿 (PRP)  
を作成した。各家兔のPRPをキューベットに分注  
し、フラン器に保った後、凝集惹起剤を添加し次  
いで比濁計を用いて光透過率をはかり、これによ  
って血小板凝集率を測定した。

凝集惹起剤として、アデノシンダイホスフェー  
ト (ADP) 5  $\mu$ Mを用いた場合と、コラーゲン  
10  $\mu$ g/mlを用いた場合について夫々血小板凝  
集率を測定した。そして投与前に採血した血液と、

7日目に採血した血漿中の血小板凝集率の平均値  
を出して比較した。

(II) 次に、脂肪輸液各試料の血漿脂質に及ぼ  
す影響を調べるべく、投与前採血した血液および  
投与量がEPA換算値でほぼ等量となるように採  
血後1日目及び4日目に90%EPA-TGはい  
ずれも30mlづつ、30%EPA-TGはいず  
れも100mlづつ静注した後、7日目に採血した血  
液について各血漿中の中性脂質とコレステロー  
ルの量を測定し比較した。

(III) 更に肝臓に及ぼす影響をみるべく同様に  
投与前採血の血液と投与後の血液について夫々血  
液中のグルタミン酸、ビルビン酸、トランスアミ  
ナーゼ酵素 (GPT) の量を測定して比較した。  
このGPTの量は肝細胞障害があると上昇するの  
で投与前後におけるその値の変動を測定する。

以下にその結果を示す。

## ○結 果

## I 血小板凝集に及ぼす作用

I - a 凝集惹起剤として、ADP5 $\mu$ M使用の場合

対 照 (大豆油)		
	投 与 前	投 与 後
1	—	—
2	59	58
3	50	50
4	53	60
5	44	36
平均±標準偏差	51.5±5.41	51.0±9.43
(有意差なし)		

90%EPA-TG			30%EPA-TG		
	投 与 前	投 与 後	投 与 前	投 与 後	
1	52	44	48.5	44	
2	53	49	51.5	54	
3	55	45	43.5	60	
4	47	41	41	50	
5	49	34	36	48.5	
平均±標準偏差	51.2±2.86	42.6±5.00	42.9±7.4	51.3±5.4	
(P<0.02)			有意差なし(P<0.2)		

I - b 凝集惹起剤としてコラーゲン10 $\mu$ g/ml使用の場合

対 照 (大豆油)		
	投 与 前	投 与 後
1	—	—
2	62	72
3	68	71
4	66	64
5	73	66
平均±標準偏差	67.25±3.96	68.25±3.34
(有意差なし)		

90%EPA-TG			30%EPA-TG		
	投 与 前	投 与 後	投 与 前	投 与 後	
1	77	72	76	74	
2	77	70	75.5	71.5	
3	74	63	70	72.3	
4	73	70	79	77	
5	76	62	70.5	73	
平均±標準偏差	75.4±1.62	67.4±4.08	74.2±3.4	73.6±1.9	
(P<0.02)			(有意差なし)		

30%EPA-TG及び対照の大豆油では投与前後で有意差はないが、高純度の90%EPA-TGでは明らかに血小板凝集能の有意低下を示している。

## (II) 血漿脂質におよぼす影響

## II a 中性脂肪

90%EPA-TG		
	投与 前	投与 後
1	51	64
2	48	65
3	69	56
4	50	92
5	67	88
平均±標準偏差	57±9.05	73±14.3

30%EPA-TG		
	投与 前	投与 後
1	91.8	84
2	89.0	134.2
3	92.3	129.2
4	64	111.8
5	96.1	260.3
6	88.7	87.3
平均±標準偏差	86.98±10.57	134.47±59.37

## II b コレステロール

90%EPA-TG		
	投与 前	投与 後
1	29	36
2	30	30
3	26	24
4	25	29
5	30	70
平均±標準偏差	28±2.1	37.8±16.5

30%EPA-TG		
	投与 前	投与 後
1	51.3	58.1
2	40.1	92.2
3	48.7	79.4
4	78.6	96.8
5	48.0	134.4
6	66.6	31.3
平均±標準偏差	55.55±13.0	82.03±32.19

どれも有意差はないが、90%EPA-TGの方が増加率が低い。

## III 肝臓への影響

## GPTの変動

90%EPA-TG			30%EPA-TG		
	投与 前	投与 後		投与 前	投与 後
1	21	27	1	28.5	60.1
2	21	25	2	23.6	40.0
3	31	33	3	45.6	60.0
4	26	39	4	66.9	99.1
5	15	11	5	43.1	55.1
平均±標準偏差	24.75±4.79	27.0±10.5	平均±標準偏差	41.54±15.19	62.86±19.55

いずれも個体間のバラツキが大きく、有意差はないものの、30%EPA-TG投与における上昇率が著しい。

## (効果)

以上の結果から明らかなように、本発明に係る高純度(90%)EPA-TG輸液によるときは30ml×2回の投与で、血小板凝集の有意低下を示し、血中脂質及びGPTの上昇はわずかであった。

これに対し、30%EPA-TGでは輸液30ml×2回の投与では前後で血小板凝集能に有意差はなく、従って血小板凝集抑制作用は示さなかった。而してEPA投与量として90%EPA-TG30ml×2回にほぼ相当する30%EPA-TGの100ml×2回投与量では血中脂質の上昇やGPTの上昇を示し高脂血症や肝機能障害を来すおそれがあることが明らかである。

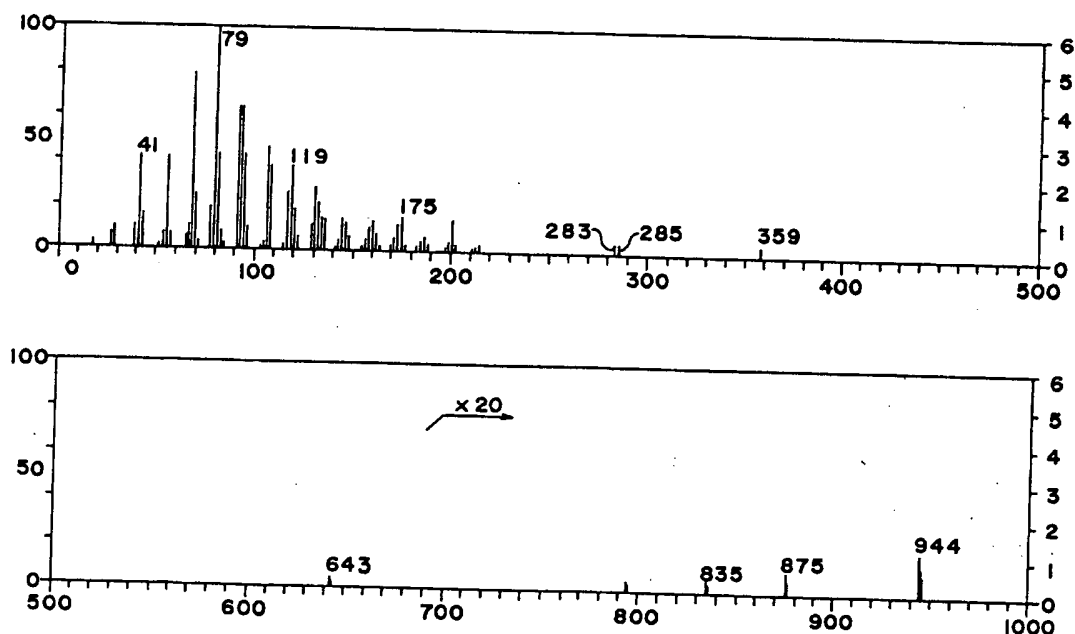
かくして高純度のEPA-TGを用いるときは低純度のEPA-TGに比して少量の投与によって、血中脂質やGPTの上昇を来すことなく、血小板凝集抑制効果をよく発揮することができる。しかも例えば上記組成の輸液として通常成人1日1回100~3000ml好ましくは500~

2000mlを静脈に注射投与しうるので、経口投与しえないような場合にも投与し得、又経口投与よりも早期に効果を発揮することができる。かくしてこの輸液は血栓性疾患の治療、予防、ひいてはガンの転移予防にも有効に用いることができる。

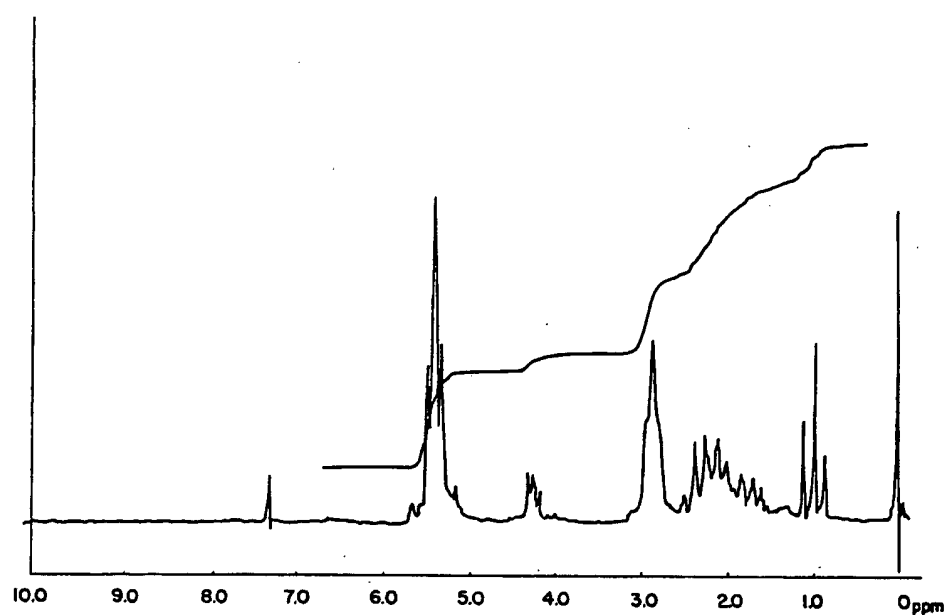
## 4. 図面の簡単な説明

図面第1、2、3図は順に本発明の製造例1によってえられた高純度エイコサペンタエン酸トリグリセリドの質量分析スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、赤外線吸収スペクトルを示す。

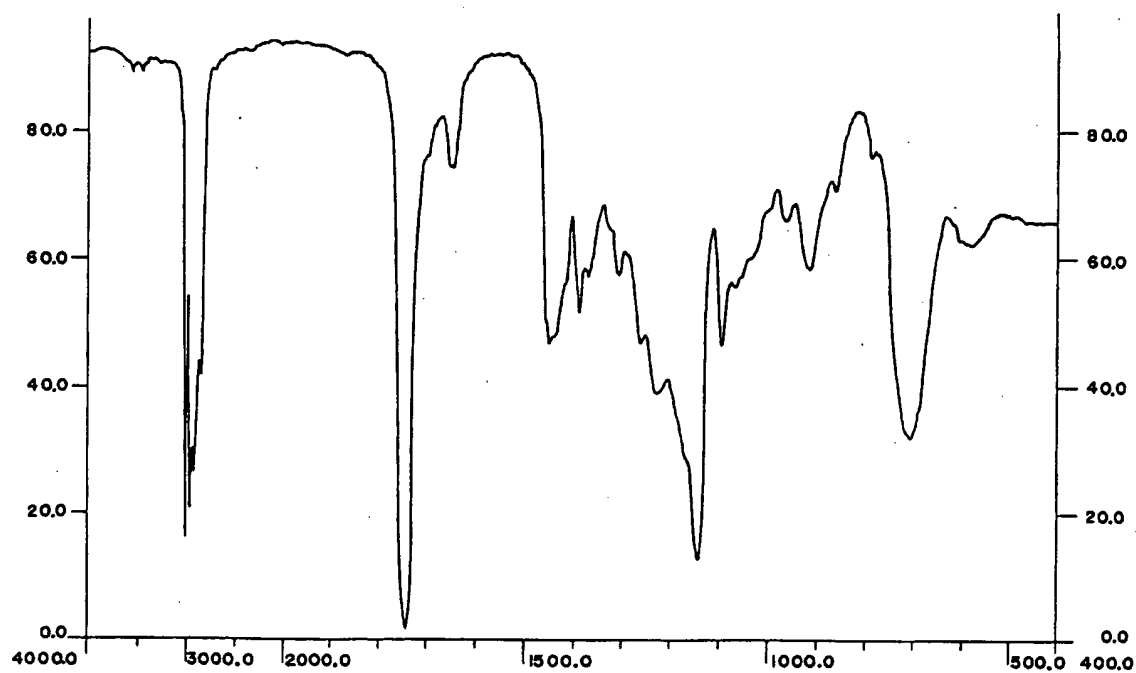
出願人代理人 佐藤 一 雄



第1図



第2図



第3図